

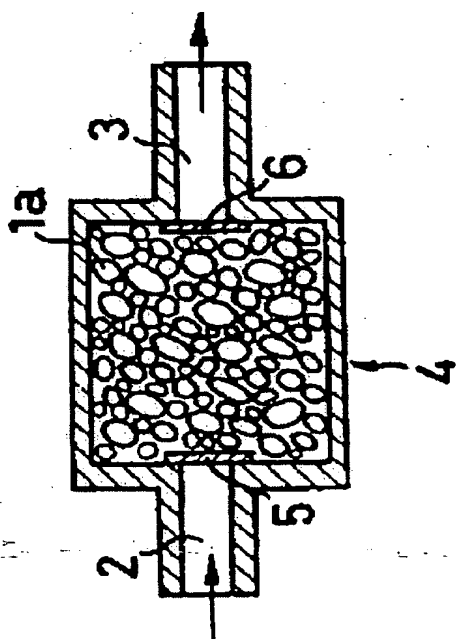
ELIMINANT OF IMMUNOSUPPRESSIVE SUBSTANCE IN HUMORS

Patent number: JP56092824
Publication date: 1981-07-27
Inventor: NOMURA TAKEO; MINOO OSAMU; ASAKURA YOSHIKAZU; MIYAUCHI YUUJI; ITOU YOSHITAKA
Applicant: TERUMO CORP
Classification:
- **International:** A61K39/395; A61K39/44
- **European:**
Application number: JP19790084764 19790704
Priority number(s): JP19790084764 19790704

Report a data error here

Abstract of JP56092824

PURPOSE: The titled eliminant reactivating immunological power of a cancer patient by passing it through humors, e.g., serum, ascites, etc. of the cancer patient to remove extraordinarily increased immunosuppressive acidic substance (IAS), etc. through adsorption, obtained by supporting an anti-IAS antibody on a carrier. **CONSTITUTION:** An anti-IAS antibody is supported on an organic or inorganic carrier (e.g., cellulose, glass, etc.). For example, the column 4 with the inlet 2 and the outlet 3 at the top and bottom ends is packed with the eliminant 1a of immunosuppressive substance obtained by the support and used. In the serum, ascites, etc. of a cancer patient, acidic protein of immunosuppressive substance: IAS, etc. increases extraordinarily, so that immunological activity of the cancer patient reduces, to increase cancerous cell abruptly. Consequently, an antibody to the IAS, etc. is produced conventionally and is supported by a carrier to give the titled eliminant, which is brought into contact with the humors of a cancer patient, to remove the immunosuppressive substance specifically and readily.



⑫ 公開特許公報 (A)

昭56—92824

⑤ Int. Cl.³A 61 K 39/44
39/395

識別記号

A B C
A B C

庁内整理番号

6408—4C
6408—4C

⑬ 公開 昭和56年(1981)7月27日

発明の数 1

審査請求 未請求

(全 6 頁)

⑭ 体液中の免疫抑制物質除去剤

① 特 願 昭54—84764

② 出 願 昭54(1979)7月4日

③ 発 明 者 野村武男

日野市百草858番地の1

④ 発 明 者 箕尾治

東京都府中市白糸台1丁目83番
6号

⑤ 発 明 者 朝倉吉一

三鷹市中原1丁目6番41号

⑥ 発 明 者 宮内雄二

立川市富士見町2丁目31番2号

⑦ 発 明 者 伊藤良孝

東京都新宿区西落合2丁目23番
7号

⑧ 出 願 人 テルモ株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番
1号

⑨ 代 理 人 弁理士 鈴江武彦 外2名

明 細 書

発明の名称

体液中の免疫抑制物質除去剤

特許請求の範囲

- (1) 抗 I A S 抗体を有機質または無機質担体に担持させてなることを特徴とする体液中の免疫抑制物質除去剤。
- (2) 抗 I A S 抗体が抗 I A P 抗体である特許請求の範囲第1項記載の体液中の免疫抑制物質除去剤。

発明の詳細な説明

本発明はガン患者の血清中および腹水中に特異物に増加する免疫抑制物質除去剤に関する。

免疫抑制物質は正常人の血清にも存在するが、量的に少ない。しかし、炎症時や担ガン状態の患者血清および腹水中には前記物質が顕著に増加することが知られている。

この免疫抑制物質としては次のものが知られている。シュミット (Schmid) により、正常ヒト血清コーン画分Ⅳから部分的に精製した分

子量5000から7000程度のポリペプチドがガン患者の血清中にもあり、これが免疫抑制活性を有することが報告された〔ジャーナル・オブ・イムノロジー (J. Immunology) 109 巻154頁 (1972年) および110巻685頁 (1973年)〕。

また、チュー (Chiu) らは、ヒトガン性腹水からアシッドグリコプロテインをアクリルアミドゲル電気泳動により精製して均質物を採り、これがフィトヘムアグルチニン (PHA) によるリンパ球の幼若化を抑制することならびにこれがシュミットらのいう低分子物質でないことを報告している〔イムノロジー (Immunology) 32 巻997頁 (1977年)〕。

また、石谷らは α_1 -アンティトリプシンが免疫抑制活性を有し、ガン患者では正常人に比べ多く検出されたことを報告している〔医学のあゆみ108巻92頁、昭和54年1月13日〕。

また、松田らは、ヒトガン患者血清および腹水あるいは担ガンマウス血清中から等電点が pH

2.9 から 3.4 であり、かつ分子量が 59,000 位である酸性タンパクを精製し、これが免疫抑制活性を有することを報告している〔医学のあゆみ 105 巻 154 頁、昭和 54 年 4 月 15 日〕。彼らはこの酸性タンパクをイムノサプレッシブ・アシディック・プロテイン (Immunosuppressive acidic protein) (以下 I A P という) と名付けた。

この I A P は正常人の場合は血清中平均 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含まれるのに対し、ガン患者では 400 ~ 2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ も含まれており、この傾向はガンの種類に拘らず同様であることが確認されている。

本発明者らは研究において、 α_1 -アジド・グリオブリン成分および I A P がともにリンパ球幼若化および遅延型アレルギー抑制活性を有することを確認した。

さらに、本発明者らは紙電気泳動により、 α -グロブリン領域からアルブミン領域へ泳動され、等電点が 2.6 から 3.4 の間にあるタンパク

3

による危険性、各種弊害を有し、さらに大量の血漿を必要とするため供血者の負担などの問題が生ずる。

本発明は上記事情に鑑みてなされたものであって、他人の供血を受けることなく、患者自身の血液または腹水等の体液中から免疫抑制物質を除去し得る媒体を提供することを目的とする。

すなわち、本発明は抗 I A S 抗体を有機質または無機質の担体に担持させてなることを特徴とする体液中の免疫抑制物質除去剤を提供するものである。さらに、望ましくは本発明は抗 I A S 抗体中に含まれる抗 I A P 抗体を有機質または無機質の担体に担持させてなることを特徴とする体液中の免疫抑制物質除去剤を提供するものである。

本発明で用いられる抗体、すなわち抗 I A S 抗体および抗 I A P 抗体ならびにそれらの製法は公知であり、本発明においてもこれら公知のものをそのまま利用し得る。抗 I A S 抗体は I A P 以外の免疫抑制物質を広く除去するのに

5

質が前述の抑制活性を有することを確認しこれをイムノサプレッシブ・アシディック・サブスタンス (Immunosuppressive acidic substance) (以下 I A S という) と名付けた。

このような免疫抑制物質の増加はガン患者のガン細胞や感染に対する免疫活性の低下を招き、ガン細胞の急激な増殖、拡大をもたらす要因となる。したがって、この免疫抑制物質を患者の血液、腹水等の体液から除去することは患者の免疫活性を回復させ、ガンの治療効果を高める上で極めて重要である。

この免疫抑制物質を除去する方法として、現在考えられている手段は血漿交換である。これは患者血液をバツグ等に採血し、遠心して血液を血球成分と血漿成分とに分離し、血球成分は洗浄後同様の遠心分離処理を行なつて得られる健康供血者の血漿成分とともに患者体内へ返還し、血漿成分は廃棄することである。

したがって、この方法は、供血者を必ず必要とし、また患者にとっては他人の血漿が入ること

4

有用である。この抗体を担持するための担体としては、有機質のもの、たとえばセルロース、アガロース、デキストラン、あるいはこれらの誘導体等の多糖類、フィブリン、コラーゲンあるいはこれらの誘導体等のタンパク質、または合成ポリマー、たとえばポリアクリル酸、ポリメタクリル酸等のポリカルボン酸、ポリステレン、ナイロンあるいはこれらの誘導体など、また無機質のもの、たとえばヒドロキシアパタイト、ガラス、酸性白土、など適宜使用し得る。このように種々の担体を使用し得るが、担体の選択にあたっては血液等の体液に対し、たとえば細胞毒性、溶血性などの悪影響のないものを適宜選択する必要がある。また、担体はシート、球体、不織布、織物、フィルター、多孔質部材が使用し得る。

抗体を常套手段によつて担体に固定化したのち、たとえば上下端に入口、出口を有するカラム、血液回路中の点滴筒、血漿バツグ、限外濾過器の濾液室に抗体を担体した球状担体を充填

6

したもの、あるいは血液回路中に抗体を担持させたフィルターを設けたものまたは血液接触面に抗体を担持させたチューブを設けたもの等に、ついで免疫抑制物質を含む血液、血漿、血清あるいは腹水等の体液を通過させると、非常に特異性の高い抗原、抗体反応によつて、抗原、すなわち、IASまたはIAPが抗体、すなわち、抗IAS抗体または抗IAP抗体に吸着する。したがつて、前記抗体を担持させた担体を通じた体液は多くのIASまたはIAPが除去されたものとなるから、この体液を再び体内に戻すことによつて、患者の免疫力を復活させ、ガンの治療効果を高めることができるものである。

以下、本発明を実施例に基づき詳細に説明する。

実施例

A. 免疫抑制物質の調製

- (1) ガン患者腹水と6 wt/V%スルホナリチル酸とを等量混合したのち、5000gで30分間遠心し、上清を得る。この上清のpHを7.5に

7

ミカル社製) につけ、溶出された第2のピークを集める。これを濃縮したものをタンパク標品-2(粗IAP)とする。

- (3) 前述のタンパク標品-2をpH2.5~6.0のカラム型等電点電気泳動につけ、等電点がpH3.0から3.4の画分を集め、PBSに対し充分に透析する。この透析内液をタンパク標品-3(IAP)とする。

- (4) 吉田肉腫腹水ガンラット(ドンリュウラット)の腹水から(2)と同様にしてタンパク標品-4(粗IAP)を得る。

- (5) 吉田肉腫腹水ガンラットの血液より血清をとり、硫酸飽和60%から90%で得られる沈殿を(2)と同様にしてタンパク標品-5(粗IAP)を得る。

- (6) エールリツヒ腹水ガンマウス(ICRマウス)の腹水を0.02M酢酸緩衝液(pH4.0)に対し、充分に透析する。生じた沈殿を除いたのち(2)と同様にしてDEAE-セファデックスカラム(ファルマシアファイン・ケミカル

9

合わせ、限外濾過膜を用い濃縮する。濃縮液を0.08Mリン酸緩衝液(pH5.0)で透析し、同緩衝液で平衡化したSP-セファデックスカラム(ファルマシアファイン・ケミカル社製)につけ、前述の緩衝液で洗浄する。このカラム通過液を食塩を0.9wt%含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.5:PBS)に対し、充分に透析する。透析内液をタンパク標品-1(IAS)とする。

- (2) ガン患者腹水の60%硫酸アンモニウム塩飽和による上清にさらに硫酸アンモニウム塩を加え、90%飽和とし、遠心し、沈殿を得る。この沈殿を0.02M酢酸緩衝液(pH4.0)に溶かし、同緩衝液で透析し、次に透析内液を同緩衝液で平衡化したDEAE-セファデックスカラム(ファルマシアファイン・ケミカル社製)につけ、同緩衝液で洗浄したのち、0.4M酢酸緩衝液を流す。溶出液を濃縮したのち、PBSで平衡化したセファデックスG-100カラム(ファルマシアファイン・ケ

8

社製) およびセファデックスG-100カラム(同社製)につけ、2番目のピーク部分を集める。さらにこれを(3)と同様にして等電点電気泳動につけ、等電点が2.8から3.3の画分を集める。これをPBSに対し、透析した透析内液をタンパク標品-6(IAP)とする。これらの免疫抑制物質の免疫抑制活性および腫瘍増殖促進活性の確認のための測定方法およびその結果は次の通りである。

イ) 免疫抑制活性測定方法

ヒト末梢血リンパ球を1.0%のウシ胎児血清を含むRPMI-1640培地で 1.0×10^5 細胞/mlに調整する。これにフィトヘムアグルチニンを15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加え、72時間培養する。このとき前述のタンパク標品-1から6を各々加え、 ^3H -TdRのとりこみの抑制でリンパ球幼若化反応抑制活性を測定する。結果は表1に示すように、それぞれ抑制活性があり、いずれも前述の標品を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えることによつて100% ^3H

10

のとりこみを抑制した。

ロ)腫瘍増殖促進活性測定方法

C3H/HeマウスにMC-A腫瘍をマウス背部皮下に

表 1

タンパク標品のPHAによるリンパ球幼若化抑制

タンパク標品の投与量 mg/ml	抑制活性 (%)					
	標品-1	-2	-3	-4	-5	-6
0.01	0	0	0	0	0	0
0.1		0	2	0	0	8
1.0	36	20	50	10	15	25
5.0		85	100	65	74	52
10.0	100	100	100	100	100	100

5×10^7 細胞を移植し、移植後1日目より隔日3回各タンパク標品2mgを清注する。最後の投与より2週間後、腫瘍の大きさをダイヤルゲージキヤリパーで測定する。測定値は腫瘍を精円体とみなし、体積を計算して表示した。結果は表2に示すようにいずれのタンパ

11

肉に2週間間隔で、1回1mgを5回投与し、最終免疫の1週間後に全血採血する。血清成分をとり、常法によつて γ -グロブリン成分を分離する。これを0.01Mリン酸緩衝液(pH 8.0)で平衡化したDEAE-セルロースカラムにかけ、素通り画分を集める。これを凝縮したのちセファデックスG-100のゲルクロマトグラフィーにかけ、最初のピークを集め、精製品とする。抗体価は一元放射免疫拡散法によつた。

C. 抗体の担体への固定化法

- (1) CNBr 活性化セファロース4B (ファルマシア社製)を0.5M NaClを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 8.3)でよく洗浄したのち、同緩衝液に溶解した抗体を混和し、室温で2時間攪拌した。残存する活性基は1Mエタノールアミン(pH 9.0)で処理する。次に0.5M NaClを含む0.1M酢酸緩衝液(pH 4.0)で洗浄し、さらに0.5Mリン酸緩衝液(pH 8.3)で洗浄し、抗体固定化セファロース4Bを得

13

ク標品も腫瘍の増大を促進させ、標品-3では無処理に比べ、腫瘍の体積は1.8倍になっている。また、生存期間でみるといずれも短縮させ、同じく標品-3では特に短縮させた。

表 2

タンパク標品の腫瘍増殖促進活性

タンパク標品	腫瘍体積 ($\times 10^3 \text{ mm}^3$)	生存日数
無処理	4.6	64
1	7.5	45
2	6.1	54
3	8.2	42
4	5.5	58
5	5.8	55
6	7.8	45

B. 抗体の製法

各タンパク標品から対応する抗体を次のようにして作製する。タンパク標品をフロイドの完全アジュバントとともにウサギ足の筋

12

た。

- (2) ビーズ状のアンバーライトIRC-50 (ロームアンドハース社製)を0.5N塩酸、蒸留水、メタノール、エーテルの順で洗浄し、乾燥する。ついで無水メタノール中に約2.6Nとなるように乾燥塩化水素ガスを溶解した溶液50倍量にアンバーライトIRC-50を加え、30℃、24時間激しく攪拌する。反応後口別し、得られたビーズをメタノール、エーテルで洗浄、乾燥する。これをメタノールの100倍量(V/W)に懸濁し、80%飽水ヒドラジンビーズの5倍量加え、3時間、66℃で還流する。反応後ビーズをメタノール、エーテルで洗浄し、乾燥する。次にこのヒドラジド化ビーズに2%塩酸100倍量を加え、冷却、攪拌しながらビーズの12倍量の3%亜硝酸ソーダを徐々に滴下し、さらに25分間攪拌し、ビーズを冷ジオキサン、冷水で順次洗浄する。得られたアジド化ビーズを抗体を溶かした0.1Mリン酸緩衝液(pH

14

8.4)に懸濁し、30℃、3時間振盪しながら結合反応を行なった。反応後、0.5Mリン酸を用いてpHを3.5～4.0に調整する。ついで濾過したのち得られた抗体固定化ビーズを水で2回洗浄後0.5Mリン酸緩衝液(pH6.0)で洗浄し、さらに水で2回洗浄して、抗体固定化アンバーライトIRC-50を得た。

ウシフィブリノーゲン(半井化学社製)にウシトロニン(持田製薬社製)を加え、フィブリン塊を作製したのち、濾紙上でプレスし、フィブリン膜をつくる。次に0.2Mリン酸緩衝液(pH7.4)にとかした6%グルタルアルデヒド溶液にフィブリン膜を浸漬し、37℃、14時間反応させる。反応後、膜を水で十分に洗浄したのち、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)にとかした抗体溶液に浸漬し、4℃、12時間おく。その後0.5M食塩水、0.1M重炭酸ソーダ水、水で順次洗浄して、抗体固定化フィブリンを得た。

前述の実施例により得られた免疫抑制物質除

15

3から明らかなように、試料をカラムに通すことによつて、試料中に含まれるIASまたはAPは全ての例で除去された。また、担体としてはフィブリン、セファロース4B、アンバーライトIRC-50の順で除去効果が高かつ

。このように、カラム4から出てくる上記試料、なわち体液は多くの免疫抑制物質が除去されるものとなるから、この体液を再び体内に戻すことによつて、患者の免疫力を復活させ、ガン治療効果を高めることができる。

17

去剤1を、ビーズ状除去剤1aは第1図に示すように、両端に入口2、出口3を有するプラスチック製透明カラム4の入口と出口に設けられたフィルター5、6内に充填し、又膜状除去剤1bは第2図に示すように、ジャバラ式に折り畳み、これを円筒状にして体液の通過を容易にして、両端に入口2、出口3を有するプラスチック製透明カラム4の入口と出口に測られたフィルター5、6内に充填した。フィルターは担体の小粒子などを除去する。これらのカラムをPBSで浸漬平衡化して、これらのカラムにガン患者腹水、血液(ヘパリン加)、担ガンラット血清、担ガンマウス血清をそれぞれ5ml流した。これらの試料中に含まれる免疫抑制物質はカラム中の除去剤と接触して非常に特異性の高い抗原、抗体反応により担体表面の抗IAS抗体または抗IAP抗体に吸着される。

前記カラムの入口と出口の試料中の免疫抑制物質、すなわちIASまたはIAPを一元放射免疫拡散法で定量的結果を表3に示す。

16

表 3
果 除 去 結 果
IAS, IAP の 吸 着
体 液 中 の IAS, IAP の 吸 着

タンパク製品 に対する抗体	担 体	試 料	IAS, IAP量(%)	
			入 口	出 口
1	(1)セファロース4B	ガン患者腹水	6.6	2.1
1	(2)アンバーライトIRC-50	"	"	5.0
1	(3)フィブリン	"	"	1.6
2	(1)セファロース4B	"	5.1	1.8
2	(2)アンバーライトIRC-50	"	"	3.9
2	(3)フィブリン	"	"	1.3
3	(1)セファロース4B	ガン患者血液	3.8	2.0
3	(2)アンバーライトIRC-50	"	4.9	4.1
3	(3)フィブリン	"	"	1.0
4	(1)セファロース4B	血液	3.5	1.5
4	(2)アンバーライトIRC-50	ラット血清	4.3	3.8
4	(3)フィブリン	"	"	1.4
5	(1)セファロース4B	"	"	1.6
5	(2)アンバーライトIRC-50	"	"	3.7
5	(3)フィブリン	"	"	1.3
6	(1)セファロース4B	マウス血清	3.8	1.2
6	(2)アンバーライトIRC-58	"	"	3.4
6	(3)フィブリン	"	"	1.2

18

また、本発明の除去剤を用いることにより、患者は自己の体液を浄化し免疫力を復活できるので他人の供血を受ける必要が全くなく、他人の供血による弊害、危険性を取り除くことができる。

また、血漿交換のように、患者、供血者双方の採血、遠心分離、輸血等の作業を必要とせず、患者のみの処理作業で済み取り扱いが容易である。

さらに、除去剤の容器としては前述のカラムの他、血液バッグ、輸血セット中の点滴筒、体液の限外濾過装置の濾液室または濾液返還回路、血液回路中のチューブなど、また除去剤がフィルター状であれば血液回路または輸血セットなどの濾過器を用いることができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の一実施例の免疫抑制物質除去剤を充填したカラムの断面図である。

第2図は本発明の他の実施例の免疫抑制物質除去剤を充填したカラムの断面図である。

1a, 1b … 免疫抑制物質除去剤

2 … 入口

3 … 出口

4 … カラム

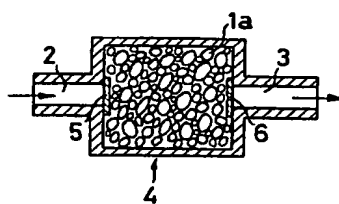
5, 6 … フィルター

出願人代理人 弁理士 鈴 江 武 彦

19

20

第 1 図



第 2 図

